

LASER SCANNING MICROSCOPE

Publication number: JP2000314839

Publication date: 2000-11-14

Inventor: YOSHIDA TAKEHIRO

Applicant: OLYMPUS OPTICAL CO

Classification:

- International: G01N21/64; G02B21/00; G01N21/64; G02B21/00;
(IPC1-7): G02B21/00; G01N21/64

- European: G01N21/64H; G01N21/64F; G01N21/64P4C

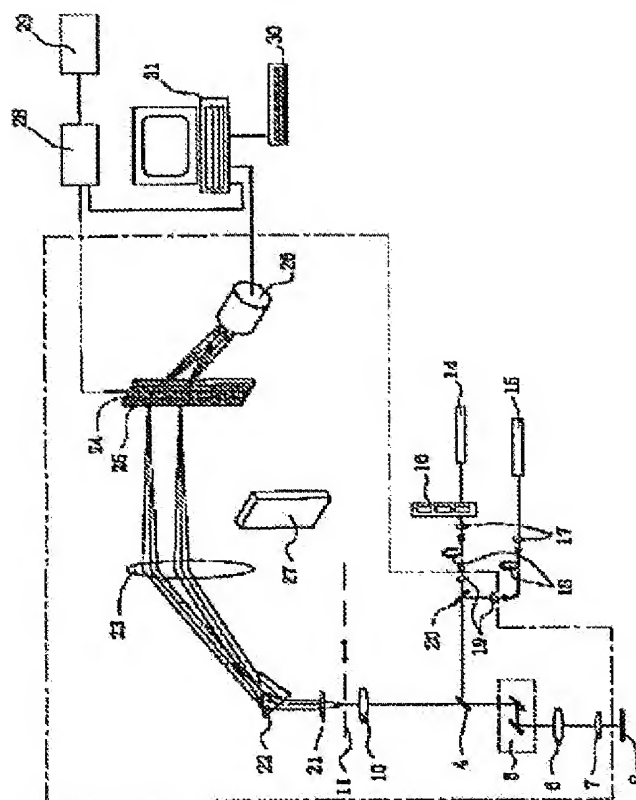
Application number: JP19990124737 19990430

Priority number(s): JP19990124737 19990430

Report a data error here

Abstract of JP2000314839

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a laser scanning microscope in which an optical filter and a mechanical driving part requiring high position reproducing accuracy are not necessitated and the change of a device constitution is not necessitated for the various kinds of the combinations of exciting wavelength and a fluorescent pigment, by which the multiexcited fluorescent image of a sample multi-colored can be obtained by one photodetector by having a high S/N and whose constitution is simple. **SOLUTION:** This microscope is provided with laser light sources 14 and 15 by which the fluorescence of a different wavelength area is generated from the sample 8, the photodetector 26 detecting the fluorescence emitted from the sample 8, a prism 22 arranged between the sample 8 and the photodetector 26 and spectrally resolving light from the sample 8, a mirror array 24 arranged between the prism 22 and the photodetector 26 and consisting of plural fine mirror elements 25 respectively receiving the various kinds of light beams spectrally resolved from the sample and reflecting only the fluorescence to the photodetector 26 and an output signal processing device 31 sampling an output from the photodetector 26.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2000-314839
(P2000-314839A)

(43)公開日 平成12年11月14日 (2000. 11. 14)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
G 0 2 B 21/00		G 0 2 B 21/00	2 G 0 4 3
G 0 1 N 21/64		G 0 1 N 21/64	E 2 H 0 5 2

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 11 頁)

(21)出願番号 特願平11-124737

(22)出願日 平成11年4月30日 (1999. 4. 30)

(71)出願人 000000376

オリンパス光学工業株式会社
東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号

(72)発明者 吉田 剛洋

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリ
ンパス光学工業株式会社内

(74)代理人 100065824

弁理士 篠原 泰司 (外1名)

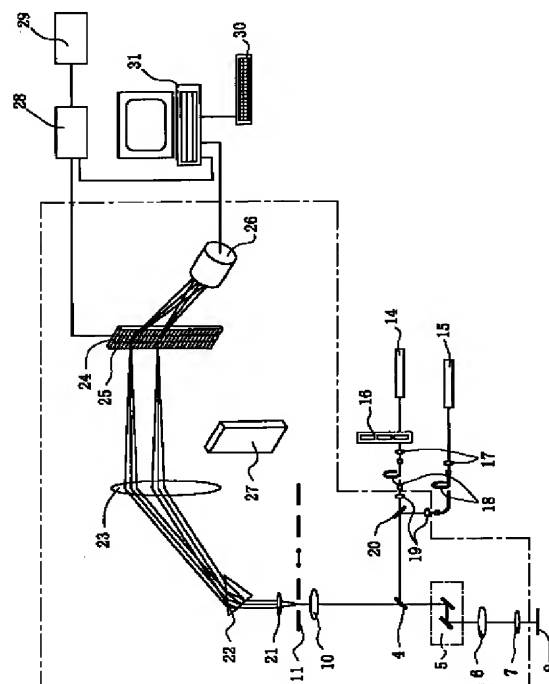
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 レーザ走査型顕微鏡

(57)【要約】

【課題】 光学フィルタや高度な位置再現精度を要する機械駆動部を必要とせず、励起波長や蛍光色素の各種組み合わせに対しても装置構成の変更を必要としない、多重染色された標本の多重励起蛍光像を一つの光検出装置でも高いS/Nをもって得ることの出来る、簡易な構成のレーザ走査型顕微鏡を提供する。

【解決手段】 標本8から異なる波長域の蛍光を発生させ得るレーザ光源14、15と、標本8から発した蛍光を検出し得る光検出装置26と、標本8と光検出装置26との間に配置されていて標本8からの光をスペクトル分解するプリズム22と、プリズム22と光検出装置26との間に配置されていてスペクトル分解された標本からの各種の光を夫々受けて蛍光のみを光検出装置26へ向けて反射し得る複数の微小ミラー素子25から成るミラーアレイ24と、光検出装置26からの出力をサンプリングする出力信号処理装置31とを備えている。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 レーザ走査型顕微鏡において、標本に照射されるべきレーザ光を射出して該標本から異なる波長域の蛍光を発生させるためのレーザ光源と、標本からの蛍光を検出する光検出装置と、標本と前記光検出装置との間に配置されていて標本からの光を空間的にスペクトル分解するスペクトル分解部材と、該スペクトル分解部材と前記光検出装置との間に配置されていて前記スペクトル分解部材によりスペクトル分解された光を受ける夫々が偏向角度を変え得る複数の微小光偏向素子で構成された微小光偏向素子アレイと、前記光検出装置からの出力をサンプリングし得る出力信号処理装置とを備え、前記微小光偏向素子アレイの少なくとも二つの微小光偏向素子により偏向された光を前記光検出装置に所定の時間差を以て入射させ、前記光検出装置からの出力を前記出力信号処理装置により前記時間差を以てサンプリングするようにしたことを特徴とするレーザ走査型顕微鏡。

【請求項2】 標本には波長の異なる少なくとも二つのレーザ光が所定の時間差を以て照射されるようにしたことを特徴とする請求項1に記載のレーザ走査型顕微鏡。

【請求項3】 前記標本から発生した蛍光の検出波長域の少なくとも一つは前記レーザ光源から射出したレーザ光の波長を含み、前記複数の微小光偏向素子のうち蛍光とレーザ光とで共通している波長の光を受ける微小光偏向素子はレーザ光が標本に当たっている時間中は該微小光偏向素子が受ける光を前記光検出装置からずれる方向に偏向させ、前記レーザ光が標本に当たっていない時間中は前記微小光偏向素子が受ける光を前記光検出装置に入射させるようにしたことを特徴とする請求項2に記載のレーザ走査型顕微鏡。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、レーザ走査型顕微鏡に関する。

【0002】

【従来の技術】一般に、蛍光検出装置は、医学及び生物学を初めその他の分野において、生物組織や細胞上で蛍光標識を施した蛋白質や遺伝子等を検出する目的で広く用いられている。特に、近年では、複数の蛍光色素で染色した標本を一度に観察する多種蛍光検出が、遺伝子の解析や細胞内構造の解明に威力を発揮している。これら蛍光検出の有効手段としてレーザ走査型顕微鏡が公知である。

【0003】図9は、これら蛍光検出用レーザ走査型顕微鏡の代表例の光学系を示しているが、図中、互いに異なる発振波長を有する三つのレーザ発振器1a、1b、1cから射出された三種類のレーザビームは、結合用ダイクロイックミラー2a、2bにより共通の光軸上に結合された後、ビームエキスパンダー3を通り、適当なビーム径に拡大されてダイクロイックミラー4で反射さ

れ、ガルバノメータミラー等のX-Y走査光学系5で偏向され、瞳リレーレンズ6及び対物レンズ7を介して集光されて、標本8上に照射されることにより、標本8はレーザスポットで走査される。レーザビームの照射により励起された標本8からの蛍光は、対物レンズ7からダイクロイックミラー4に至る経路を戻り、ダイクロイックミラー4を透過し、分光用ダイクロイックミラー9aで分光される。ダイクロイックミラー9aで反射された一方の蛍光は、結像レンズ10aで集光され、共焦点絞り11aを通して、吸収フィルタ12aにより目的とする第一の蛍光以外の波長の蛍光が吸収または反射された後、光検出器13aでその強度が検出される。

【0004】共焦点絞り11aは、対物レンズ7の焦点位置と光学的に共役な位置に配置されて、レーザスポットで励起された蛍光以外の光を遮断するため、得られる画像は非常にコントラストが高く、更に、標本8と対物レンズ7との間の距離を相対的に光軸方向に変えることによって三次元像を得ることが出来るようになる。他方、ダイクロイックミラー9aを透過した蛍光は、ダイクロイックミラー9bで更に分光され、ダイクロイックミラー9bで反射された蛍光は、結像レンズ10bで集光され、共焦点絞り11bを通り、目的とする第二の蛍光のみを透過させる吸収フィルタ12bを経て、光検出器13bにより光強度が検出される。また、ダイクロイックミラー9bを透過した蛍光は、結像レンズ10cで集光され、共焦点絞り11cを通り、目的とする第三の蛍光のみを透過させる吸収フィルタ12cを経て、光検出器13cで検出される。

【0005】この光学系では、各レーザ発振器1a、1b、1cから射出される三波長のレーザビームによる三重励起蛍光の同時検出が可能であり、レーザ波長の変更、蛍光色素の種類や励起レーザ波長の数等、多重励起の状態が変わる毎にダイクロイックミラー2a、2b、4、分光用ダイクロイックミラー9a、9b、吸収フィルタ12a、12b、12cは最適な分光特性を有するものに変更される。

【0006】しかしながら、光学フィルタを用いる上記従来の蛍光用レーザ走査型顕微鏡は下記の如き問題点を有する。即ち、1) 光学フィルタは、製造上の制限から自在にその分光特性を決定することができないので、蛍光光量やS/Nに限界がある。特に、吸収フィルタでは励起光を完全に遮断する必要があるが、励起波長近傍の最も蛍光強度が強い波長領域の蛍光を光量損失なしに透過させるように設計し製造することは不可能であること、2) 励起波長、蛍光色素毎に専用の高価な光学フィルタを用意せねばならず、様々な多重励起を想定した場合はフィルタ枚数の膨大化、装置構成の複雑化及び大型化が避けられないこと、3) 図9から明らかなように、蛍光用レーザ走査型顕微鏡では、多重蛍光の分光は複数の光学フィルタを介して行われるため、蛍光が光検出器

に到達するまでに相当の光量損失があること、等である。

【0007】従来、これらの問題点を改善すべく光学フィルタを用いずに複数の蛍光波長を選択、検知する手段が提案されている。即ち、特表平9-502269号公報に開示された技術は、プリズム等でスペクトル分解された光束を、スリット状のミラーで透過する第一の波長領域と反射する第二の波長領域とに分光し、更にスリット状ミラー及び第二の波長領域を制限する第二のスリット位置とスリット幅を制御して、任意の二つの波長領域を選択、検出することが出来る分光装置及び共焦点蛍光顕微鏡に関するものである。また、特開平8-43739号公報に開示された技術は、共焦点絞り通過後の光束をグレーティングにより分光し、少なくとも一つのスリットによって波長領域及び波長幅の選択を行い、各波長領域の光量を光検出器で検出するようにした走査型光学顕微鏡に関するものである。これら二つの技術は、共に多重励起蛍光検出において、光学フィルタを使用することなく確実に励起波長を遮断し且つ十分な蛍光光量を確保して、S/Nの良い蛍光検出が可能な走査型光学顕微鏡を提供している。

【0008】また、光学フィルタを用いずに任意の波長選択が可能な分光装置として、特開平6-207853号公報に開示されたものがある。これは、光分散素子によって被検出光束を空間的にスペクトル分解し、分散スペクトルの少なくとも一部を変形可能なミラー装置によって代表される空間光変調器で受け、所望のスペクトル領域のみを反射または透過させて、そのエネルギー強度を検出するようにしたものである。一度、光分散素子と空間光変調器及びエネルギー検出器の関係が固定されると、空間光変調器以外の総ゆる機械的動きを必要としないため、そこで生じる誤差や高精度な機械制御部をなくすことが出来る。ここで、変形可能なミラー装置とは詳しくは米国特許第5061049号に記載されているもので、マイクロミラーの空間的なアレイから成り、各マイクロミラーは印加電圧の制御のみによって選択的に予め選択された角度に偏向可能な素子である。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、前記特開平8-43739号公報に開示された方法は、波長選択を決定するスリットに機械的な動きが伴い、その稼働部に非常に高度な制御構造が必要となるばかりか、機械的駆動部の振動や摩耗は測定時の再現性を失わせ、校正の問題を惹起する。特に、スリット状のミラーと第二のスリットは、分光の際に夫々が連動した動きを必要とするため、その制御の高精度化は極めて困難である。更に、同時検出すべき蛍光の種類が増えると、上記分光手段の一つでは足りず、同様な波長分割手段を幾つも使用することが必要となり、光量損失と装置の複雑化を惹起すると言う問題点がある。

【0010】また、前記特表平9-502269号公報に開示された方法は、上記の場合と同様に機械駆動部の精度や再現性を保証する校正の問題の他に、一つの光検出器で検出できる波長帯域が、グレーティングなどのスペクトル分散手段と光検出器の初期配置で決定されてしまうため、広波長帯域における波長選択の自由度が低く、多重励起蛍光検出における蛍光色素やレーザ波長の多様性に対応できないと言う問題がある。

【0011】また、前記特開平6-207853号公報に開示された分光装置は、任意の波長領域における光の光量検出を行えることから、一つの励起波長に対して一つの蛍光を得るのには、蛍光用レーザ走査型顕微鏡への応用は可能であるが、励起波長や蛍光色素の総ゆる組み合わせに対応して、多重化した蛍光強度を時間的に同時検出する方法として、容易に蛍光用レーザ走査型顕微鏡に組み込めるものではない。

【0012】本発明は、従来の技術の有するこのような問題点を鑑みてなされたものであり、その目的とするところは、光学フィルタや高度な位置再現精度を要する機械駆動部を必要とせず、励起波長や蛍光色素の様々な組み合わせに対しても装置構成の変更を必要としない、多重染色された標本の多重励起蛍光像を蛍光の数だけ光検出器を用いずに高いS/Nをもって得ることの出来る、簡易な構成のレーザ走査型顕微鏡を提供しようとするものである。

【0013】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するために、本発明によるレーザ走査型顕微鏡は、標本に照射されるべきレーザ光を射出して該標本から異なる波長域の蛍光を発生させるためのレーザ光源と、標本からの蛍光を検出する光検出装置と、標本と前記光検出装置との間に配置されていて標本からの光を空間的にスペクトル分解するスペクトル分解部材と、該スペクトル分解部材と前記光検出装置との間に配置されていて前記スペクトル分解部材によりスペクトル分解された光を受ける夫々が偏向角度を変え得る複数の微小光偏向素子で構成された微小光偏向素子アレイと、前記光検出装置からの出力をサンプリングし得る出力信号処理装置とを備え、前記微小光偏向素子アレイの少なくとも二つの微小光偏向素子により偏向された光を前記光検出装置に所定の時間差を以て入射させ、前記光検出装置からの出力を前記出力信号処理装置により前記時間差を以てサンプリングするようにしたことを特徴としている。

【0014】また、本発明によれば、標本には、波長の異なる少なくとも二つのレーザ光が所定の時間差をもって照射されるようになっている。

【0015】また、本発明によれば、前記標本から発生した蛍光の検出波長域の少なくとも一つは前記レーザ光源から射出したレーザ光の波長を含み、前記複数の微小光偏向素子のうち蛍光とレーザ光とで共通している波長

の光を受ける微小光偏向素子はレーザ光が標本に当たっている時間中は該微小光偏向素子が受ける光を前記光検出装置からずれる方向に偏向させ、前記レーザ光が標本に当たっていない時間中は前記微小光偏向素子が受ける光を前記光検出装置に入射させるようにしたことを特徴としている。

【0016】

【発明の実施の形態】本発明の実施の形態を説明するに先立ち、本発明に係るレーザ走査型顕微鏡の作用・効果について説明する。先ず、請求項1に記載の本発明によるレーザ走査型顕微鏡によれば、標本から発生した蛍光と標本面で反射したレーザ光源からのレーザ光を空間的にスペクトル分解した後、蛍光のみを微小の波長幅毎に時間差をもって光検出装置へ導き、多重染色された標本の蛍光波長域に応じてサンプリングする時刻を少しずつ変えることによって、検出したい蛍光毎の光検出装置を必要とせず、多くの種類の多重励起蛍光を分光し検出することが出来る。即ち、前記のスペクトル分解された光は、標本で反射したレーザ光とは異なる波長域の蛍光から成る。これらの蛍光は、空間的にスペクトル分解されて、その方向に配列された微小光偏向素子から成る微小光偏向素子アレイへ投影される。先ず、微小光偏向素子は特定の波長域の第一の蛍光を光検出装置へ入射させ、これとは異なる波長域の第二の蛍光と前記レーザ光は光検出装置へ入射しない方向に偏向させ、次に、時間差をおいて微小光偏向素子は前記第二の蛍光を光検出装置へ入射させる状態にされる。微小光偏向素子は、このような動きを繰り返して異なる波長域の蛍光を交互に光検出装置へ入射させることにより、一つの光検出装置で異なった波長域の蛍光像を作ることが出来る。この場合、微小光偏向素子の光偏向角度をステップ状に変化させる以外に機械的駆動部を必要とせず、検出したい蛍光波長が変わっても装置の変更や部品の入れ替えは不要である。また、微小光偏向素子の光偏向角度は電氣的デジタル信号で制御可能であるため、装置自体に高い精度も複雑な構成も必要としない。また、使用するレーザ光源は連続発振のものでもパルス発振のものでも構わない。

【0017】請求項2に記載の本発明によるレーザ走査型顕微鏡によれば、異なった波長のレーザ光が時間差をもって標本に照射されるため、標本から発生する蛍光もレーザ光出射の時間に同期して発生する。このため、検出したい異なる波長域の蛍光がこの段階で既に時間分解される。これらの標本から発生した蛍光と該標本面で反射したレーザ光を空間的にスペクトル分解した後、微小光偏向素子によって蛍光波長毎に夫々光検出装置へ導き、レーザ光源の照射時間に同期するようにサンプリングすることによって、一つの光検出装置により異なった波長域の蛍光を分光検出することが出来る。更に、前記レーザ光の波長と蛍光の波長が一致していない場合は、微小光偏向素子の光偏向角度は、検出したい複数の蛍光

波長に対応する微小光偏向素子から、若しくは異なった蛍光波長域に対応する連続する微小光偏向素子群から光検出装置へ偏向させる光を導くように、更に、レーザ光源の波長に対応する微小光偏向素子のみを光検出装置とは異なる方向へ導くように予めセットしておけば、それ以降各微小光偏向素子を駆動させる必要はなくなる。別の波長のレーザ光を出射するレーザ光源とその照射によって標本から発生する蛍光を検出する場合においても、その蛍光の波長域とレーザ光の波長とに夫々対応する微小光偏向素子を前述のようにセットしておけば、装置の構成を変える必要はない。かくして、本発明によれば、像のコントラスト低下の原因となる標本から反射するレーザ光を完全に排除することが出来る。また、光検出装置を複数用意することなく多重化された蛍光を分離し、異なった波長域の蛍光を検出することが出来る。更に、前記時間差を十分小さくすれば、各波長域の蛍光を殆ど同時に検出することが出来る。

【0018】請求項3に記載の本発明によれば、標本から発生した蛍光の検出波長域の少なくとも一つは、レーザ光源から出射するレーザ光の波長を含むため、蛍光と該レーザ光とで共通した波長の光を受ける微小光偏向素子は、常に光検出装置へ光を入射させる状態にして置くことは出来ない。従って、レーザ光が標本に当たっている時間中は微小光偏向素子は光検出装置へ光を入射させない方向へ偏向され、レーザ光が標本に当たっていない時間中は光検出装置へ光を入射させる方向へ偏向させるように制御される必要がある。これに対し、レーザ光の波長と蛍光の波長とが重ならない波長域に対応する微小光偏向素子、即ち、蛍光は受けるがレーザ光は受けない微小光偏向素子は受けた光を光検出装置へ入射させる状態にして置き、また蛍光の波長と重なる波長のレーザ光を受ける微小光偏向素子は受けた光を光検出装置へは入射させない状態にして置けば、蛍光観察中は微小光偏向素子の何れも駆動させる必要はなくなる。この場合、レーザ光も蛍光も受けない微小光偏向素子はどのような状態に置かれても構わないことは云うまでもない。

【0019】以下、本発明の実施の形態を図示した各種実施例を参照して詳細に説明する。図中、従来例で用いたのと実質上同一の部材には同一符号が付され、それについての詳細な説明は省略されている。

実施例1

図1は本発明に係るレーザ走査型顕微鏡の第1実施例を示す図である。図中、14は波長488nmと568nmと647nmの光を同時発振するマルチラインKr-Arレーザから成る光源、15は波長351nmの光を発振するArレーザから成る光源、16はレーザラインフィルタ、17はファイバカップリングレンズ、18はシングルモードファイバ、19はビームコリメートレンズ、20はダイクロイックミラー、21はコリメートレンズ、22はスペクトル分解部材であるプリズム、23は集光

レンズ、24は多数の微小ミラー25で構成されるミラーアレイ（微小光偏向素子アレイ）、26は光検出装置、27は光トラップ、28はコントローラ、29はメモリー部、30は入力部、31は出力信号処理装置である。なお、標本8、レーザ14及び15、ファイバカップリングレンズ17、ファイバ18、コントローラ28、メモリー部29、入力部30及び出力信号処理装置31を除く構成部材は、レーザ走査型顕微鏡本体内に収納されている。

【0020】上記第1実施例において、各レーザ14、15から射出したレーザ光は、ファイバカップリングレンズ17を経てシングルモードファイバ18を通り、レーザ走査型顕微鏡本体内に導入される。この場合、レーザ14から射出したレーザ光は、レーザラインフィルタ16により励起波長を選択される。レーザ走査型顕微鏡本体内に導入されたレーザ光は、レンズ19により適当なビーム径を有する平行光束に変換され、ダイクロイックミラー20によって混合される。混合されたレーザ光は、励起用ダイクロイックミラー4で反射されてガルバノメータミラー等のX-Y走査光学系5において偏向され、瞳リレーレンズ6と対物レンズ7を介して標本8上に達し、レーザスポットによる走査が行われる。

【0021】かくして、レーザ光の照射により励起された標本8からの蛍光は、対物レンズ7からダイクロイックミラー4に至る経路を戻り、ダイクロイックミラー4を透過して結像レンズ10で集光され、共焦点絞リ11を通過する。共焦点絞リ11を通りコリメートレンズ21で平行光にされた蛍光光束は、プリズム22によってその波長情報が出射角度の差異に変換され、更に集光レンズ23を経てミラーアレイ24上に結像される。この時、プリズム22からの出射角度の差異に変換された波長情報は、ミラーアレイ24上の位置情報に置換され、微小ミラー素子25の位置がそのまま波長に対応せしめられるようになる。この場合、プリズム22の代わりに、グレーティング、音響光学素子、ホログラフィック素子など他のスペクトル分解素子が用いられても良い。また、集光レンズ23は、シリンドリカルレンズ等スペクトル分解方向にパワーを有するどのような光学系により置換されても良い。

【0022】微小ミラー素子25は、各々がそこに入射した光束を検出装置26へ向けて反射する偏向角と光トラップ27へ向けて反射する偏向角とを選択することができ、その角度選択は入力部30から出力信号処理装置31を経てコントローラ28からの電気信号で一素子単位で行うことが出来る。また、入力部30を介してレーザや蛍光色素に対する何らかの入力を行うと、コントローラ28がメモリー部29に記憶されている各微小ミラー素子25の角度状態を呼び出し、何時でも最適な測定状態を再現することが出来るようになっている。反対に、微小ミラー素子25の角度状態をメモリー部29へ

記憶させることも出来る。

【0023】以下、多重化された蛍光の分光作用について説明する。まず、総ての波長に対応する微小ミラー素子25が、入力光を光トラップ27へ向けて反射するようにセットされる。そして、第一の蛍光波長に対応する微小ミラー素子がその蛍光を検出装置26へ向けて反射するように制御される。これにより、光検出装置26からの信号を出力信号処理装置31がサンプリングし、第一の蛍光の強度が検出され、検出された信号を受け、コントローラ28によりその微小ミラー素子は、入射光を光トラップ27へ向けて反射させるか、又はメモリー29に記録された一定時間だけその微小ミラー素子は入射光を光検出装置26へ向けて反射させ、その後再び入射光を光トラップ27へ向けて反射させる。その後、第二の蛍光波長に対応する微小ミラー素子が同様の動作を行い、第二の蛍光の強度がサンプリングされる。この繰り返しにより、観察される総ての蛍光波長の強度が検出される。

【0024】従って、観測される蛍光波長域が三つの場合例えば三つの異なる波長域の蛍光を発する蛍光色素が使われた場合、光検出装置26から出力される信号は、図2に示されたようになる。図2において、縦軸は検出された蛍光の強度を、横軸は時間を表している。各蛍光は光検出装置26に、時間差をもって順に入射するため、時間軸上の異なる時刻において第一、第二、第三のピークが発生する。そして、夫々第一、第二及び第三の蛍光を表わす信号に対応する。 t_1 、 t_2 及び t_3 を第一、第二及び第三の蛍光のサンプリング時間とすることにより、各蛍光の強度が検出される。 t_1 、 t_2 及び t_3 を完全に含むように T_2 を決め、この T_2 が走査手段が一画素を走査する時間よりも短ければ、各画素を走査する時間中に三つの蛍光の信号のサンプリングを行うことにより、出力される総ての画素において標本を一度走査するだけで三つの波長域の蛍光像が得られる。この場合、多重化される蛍光色素の数によらず微小光偏向素子25による一度の反射によって分光が行われるので、光量損失は極めて少ない。

【0025】ここで、励起波長と蛍光色素を変更する場合を考える。今、351nm、488nm、568nm及び647nmの四重励起波長に対して、各波長で励起される四種類の蛍光色素で標本8が染色されているものとする。そして、351nmの波長の励起光で励起される蛍光色素は、488nmより長波長の蛍光を発することは無いものとする。同様に、488nmの波長の励起光で励起される蛍光色素は568nmより長波長の蛍光を発することはなく、568nmの波長の励起光で励起される蛍光色素は647nmより長波長の蛍光を発することは無いものとする。

【0026】図3はミラーアレイ24における微小ミラー素子25の配置を示している。図3(a)において、

微小ミラー素子25e, 25f, 25g, 25hは夫々351nm, 488nm, 568nm, 647nmのレーザ波長に対応していて、入射光を光トラップ27へ偏向させる向きに配置されている。微小ミラー素子25a, 25b, 25c, 25dは夫々波長351nm, 488nm, 568nm, 647nmで励起された蛍光波長域に対応し、入射光を光検出装置26へ入射させるように偏向させる向きと、光検出装置26から外れるように偏向させる向きとに切り替えられるようになっている。標本8は、四種類の波長の光で同時に励起されると、四つの異なった波長域の蛍光を発する。今、ミラーアレイ24は微小ミラー素子25aの領域に入射する光のみを光検出装置26へ向かわせるような状態にあるものとする、波長351nmの励起光で励起される色素の蛍光のみが検出装置26により検出される。一定時間経過後ミラーアレイ24の微小ミラー素子の向きが変わって微小ミラー素子25bの領域に入射する光のみを光検出装置26へ向かわせるようにすると、波長488nmの励起光で励起される色素の蛍光のみが光検出装置26により検出されるようになる。同様にして、波長568nm及び647nmの励起光で夫々励起される色素の蛍光が光検出装置26により順次検出される。従って、この一連の動作が一画素を走査するのに要する時間内で完了するように設定しておけば、標本8を複数波長のレーザビームで走査することにより四重染色蛍光画像を得ることが出来る。

【0027】次に、波長351nmと568nmの励起光で励起される二種類の蛍光色素によって標本8が染色されている場合について説明する。この場合の蛍光色素は、上述の如き四重励起の場合の色素とは異なり蛍光波長域が広く、波長351nmの励起光で励起される蛍光色素は568nmよりも短波長域の励起光で蛍光を発し、波長568nmの励起光で励起される蛍光色素は700nmを越える波長の励起光でも蛍光を発するものとする。二種類の波長のレーザが標本8に照射されると、標本からは二種類の異なった波長域の蛍光を発生するが、図3(b)に示されるように励起波長に対応する微小ミラー素子25e, 25gは、そこに集光された蛍光を光トラップ27へ向けて偏向させ、波長351nmの励起光で励起された蛍光は、その波長に対応する微小ミラー素子25a, 25f, 25bにより光検出装置26へ向けて反射され、蛍光検出後光トラップ27へ向けられる。この間に光検出装置26に向けられた蛍光の強度信号がサンプリングされる。また、この時微小ミラー素子25c, 25h, 25dは入射した蛍光を光トラップ27へ向かわせるような状態にされている。次に、波長568nmの励起光で励起された蛍光に対応する微小ミラー素子25c, 25h, 25dが向きを変えて入射した蛍光を光検出装置26へ向かうようにし、蛍光強度をサンプリングして検出するこの一連の動作を一画素を走査する時間内に完了するように設定し、標本8を二種類の波長を含むレーザビ

ームで走査することにより二重染色蛍光画像を得ることが出来る。

【0028】同様に、レーザ光源自体が変更された場合でも、入射した光束を光検出装置26へ向けて反射させたり、光トラップ27に向けて反射させたりする微小ミラー素子を、どのミラー素子にするか適当に選択することにより対応することが出来る。このように、励起波長と蛍光色素の様々な組み合わせに対し常に最適な分光が行えるのは、各微小ミラー素子の向きを任意に制御して、各蛍光毎に光検出装置26に入射している時に必ずサンプリングがなされるからである。このように、本実施例によれば、光学フィルタを使用することなく、また高度な位置再現精度を要する機械駆動部を必要としない簡易な構成で、更に、励起波長や蛍光色素の様々な組み合わせに対しても、装置構成を変更することなしに多重染色された標本の多重励起蛍光画像を高いS/Nをもって得ることが出来る。また、本実施例によれば、標本から発生した蛍光と標本面で反射したレーザ光源からの光を空間的にスペクトル分解した後、スペクトル分解された光を微小の波長幅毎に時間差をもって光検出装置へ導き、多重染色された標本の蛍光波長域に応じてサンプリングする時刻を少しずつ変えることによって、検出したい蛍光毎に光検出装置を設けることなく、単一の光検出装置で多種類の多重励起蛍光を分光し検出することが出来る。また、微小ミラー素子の光偏向角度をステップ状に変化させること以外に機械的駆動部を必要とせず、検出したい蛍光波長が変わっても装置の変更や部品の入れ替えも不要である。また、微小ミラー素子の光偏向角度は電氣的デジタル信号で制御可能であるから、装置自体に高い精度も複雑な構成も必要としない。また、レーザ光源は連続発振でもパルス発振でも構わない。また、前述の時間差を十分小さくすることにより夫々の蛍光を殆ど同時に検出することができる。

【0029】実施例2

図4は本発明に係るレーザ走査型顕微鏡の第2実施例を示す図である。図中、第1実施例と実質上同一の部材には同一符号が付され、詳細な説明は省略されている。この実施例は、各レーザ14, 15とダイクロイックミラー20との間の光路中に各レーザ14, 15からのビームを遮るシャッター32が備えられている点で、第1実施例とは異なる。

【0030】以下、波長351nmと568nmの励起光を用いる二重励起の場合を例にとり、異なる二つの波長域の蛍光を検出する場合について説明する。先ず、総ての波長に対応する微小ミラー素子25は、入射光を光検出装置26へ向けて反射させる向きにして置く。図3

(b)の微小ミラー素子を用いると、励起光のレーザ波長に対応する微小ミラー素子25e, 25gは、入射光を光トラップ27へ向けて反射させる向きにされており、以後、この微小ミラー素子25を制御する必要はな

い。図5において、 t_{11} 、 t_{12} は、シャッター32の開閉により時間差 T_3 をもって各レーザ14、15から標本8上にレーザビームが照射されている時間を表している。このレーザ照射によって標本8から発生する蛍光は、各蛍光の波長に対応する微小ミラー素子25a、25f、25b及び25c、25h、25dにより反射されて光検出装置26に向うが、各レーザビームはシャッター32の開閉により二者択一的に一方のみが交互に標本8上に照射されるため、二種類の蛍光が同時に光検出装置26に入射することはない。標本8へのこのレーザ光入射により、発生する蛍光の時間に対する強度の変化は図4に示されたようになる。この場合、各蛍光のサンプリング時間を t_{s1} 、 t_{s2} とすることによって各蛍光は分離することができ、その強度が検出され得る。

【0031】この実施例において、シャッター32は機械式のシャッターに限らず、カーセルや微小ミラー素子など光の透過と遮断を制御できるものであれば何でも良い。更に、シャッターを用いずに何らかの方法でレーザ14、15自身を交互に点滅させることが出来ればそれでも構わない。なお、走査手段が一面素を走査する時間と時間 T_2 との関係は、第1実施例で述べたのと同様であるので説明を省略する。

【0032】実施例3

第3実施例としては、再び図4を参照して、波長351nmと488nmの励起光を用いる二重励起の場合を取り上げ、異なる二つの波長域の蛍光を検出する場合について説明する。先ず、総ての波長に対応する微小ミラー素子25は、入射光を光検出装置26へ向けて反射させる向きにして置く。波長351nmの励起光に対応する微小ミラー素子25のうち25e（図3（c）参照）は、入射光を光トラップ27へ向けて反射させる向きにあるとする。先ず、波長351nmのレーザビームが標本8に照射されている時間 t_{11} （図5参照）中に標本8から発生する蛍光は、その蛍光波長域に対応する微小ミラー素子25a、25f、25bにより反射されて光検出装置26へ向う。次に、波長488nmのレーザビームが標本8に照射されている時間 t_{12} （図5参照）中に標本8から発生する蛍光は、その蛍光波長に対応する微小ミラー素子25b、25g、25c（図3（c）参照）により反射されて光検出装置26へ向う。この時、波長488nmのレーザビームに対応する微小ミラー素子25fへ入射するレーザ光は光トラップ27へ向けて反射されるように、微小ミラー素子25fは制御される。シャッター16により二種類のレーザビームが同時に標本8に照射されることはないから、二種類の蛍光が同時に光検出装置26へ入射することはない。この実施例において、発生する二種類の蛍光の時間に対する強度の変化は図5に示されている。各蛍光のサンプリング時間を t_{s1} 、 t_{s2} とすることにより、各蛍光は分離できその強度が検出される。

【0033】また、図6において、 t_a は第一の蛍光のサンプリング終了時刻を、 t_b は第二の蛍光の光検出装置26への入射開始時刻を夫々示している。この図に示されているように、時刻 t_a が t_b よりも早い場合には、このサンプリングによって得られる信号強度は第一の蛍光によるもののみであり、第二の蛍光によるものが混ざることはない。このようにすることにより、各蛍光の強度が混ざることなくサンプリング出来るので、得られた画像のコントラストの低下は確実に防ぐことが出来る。更に、図6において、 T_4 はレーザビームの照射時間、 T_5 はレーザビームの照射により発生する蛍光のライフタイム、 T_6 は蛍光のサンプリング時間である。この図から明らかなように、時間 T_4 と T_5 の合計時間は、時間 T_6 よりも短く而もその時間帯に含まれるように構成されているから、発生した蛍光を無駄なくサンプリングすることが出来る。また、図7に示すように、各レーザビームの照射時間 t_{11} （ t_{12} ）と各蛍光のライフタイム t_{f1} （ t_{f2} ）の和が各蛍光のサンプリング時間 t_{s1} （ t_{s2} ）と等しくなるようにし、更に照射時間 t_{11} （ t_{12} ）を短くすると総ての画素において多色の蛍光像が得易くなる。

【0034】実施例4

図8は本発明に係るレーザ走査型顕微鏡の第4実施例を示す図である。図中、第1実施例と実質上同一の部材には同一符号が付されており、詳細な説明は省略されている。この実施例は、光検出装置が二つ備えられている点で、第1実施例とは異なる。即ち、26a、26bは二つの光検出装置であって、四重励起の場合を考えると、第一と第二の蛍光を光検出装置26aで、第三と第四の蛍光を光検出装置26bで夫々検出するように構成される。また、三重励起の場合は、光検出装置26aで第一と第二の蛍光を、光検出装置26bで第三の蛍光を検出するように構成される。この場合は、光検出装置26bから出力される信号は一つの蛍光強度を表わすので時間分解する必要がない。この実施例におけるその他の作用効果は、第1実施例について述べたのと同様であるので、説明を省略する。なお、光検出装置の数は2つに限定されない。

【0035】以上説明したように、本発明のレーザ走査型顕微鏡は、特許請求の範囲に記載した特徴の他に下記の特徴を有している。

（1）レーザ光源は異なる波長域の蛍光を同時に発生させ得るように構成されていることを特徴とする請求項1に記載のレーザ走査型顕微鏡。

【0036】（2）前記所定の時間差を T_1 、レーザ走査型顕微鏡が備えている走査手段が一面素を走査する時間を T_2 としたとき、 $T_2 > T_1$ なる条件を満たすように構成されていることを特徴とする請求項1又は上記

（1）に記載のレーザ走査型顕微鏡。これにより、走査手段が一つの画素を走査する間に異なった波長域の蛍光

の強度を総てサンプリングすることが出来る。総ての画素においてそれがなされれば、標本の検出範囲を一度走査するだけで、出力画面において検出したい波長域それぞれの蛍光像を得ることが出来る。

【0037】(3) レーザ走査型顕微鏡が備えている走査手段が一画素を走査する時間を T_2 、波長の異なる少なくとも二つのレーザ光が標本に照射される所定の時間差を T_3 としたとき、 $T_2 > T_3$ なる条件を満たすように構成されていることを特徴とする請求項2又は3に記載のレーザ走査型顕微鏡。これにより、走査手段が一つの画素を走査する間に異なる波長域の蛍光の強度を総てサンプリングすることができる。総ての画素においてそれがなされれば、標本の検出範囲を一度走査するだけで、出力画面の総ての画素において検出したい夫々の波長の蛍光像を得ることが出来る。

【0038】(4) 光検出装置へ時間的に連続して入射する二つの波長域の蛍光について、先に入射した蛍光の強度のサンプリング終了時刻が、後に入射する蛍光の前記光検出装置への入射時刻よりも早くなるように構成したことを特徴とする請求項2又は3又は上記(3)に記載のレーザ走査型顕微鏡。これにより、光検出装置に入射する蛍光は時間的に重なることがなくなる。光検出装置に蛍光が入射しない時間に蛍光のサンプリングをリセットすることによって、各蛍光の強度が混ざることなくサンプリングできるので、蛍光像のコントラストの低下を防ぐことが出来る。

【0039】(5) レーザ光の照射時間を T_4 、レーザ光の照射により発生する蛍光のライフタイムを T_5 、前記蛍光のサンプリング時間を T_6 としたとき、 $T_6 \geq T_4 + T_5$ なる条件を満たすように構成したことを特徴とする上記(4)に記載のレーザ走査型顕微鏡。これにより、発生した蛍光の全量がサンプリングできるので、単位時間当たりの蛍光強度が小さい場合でも蛍光を測定することが出来る。

【0040】(6) 前記時間 T_6 の開始は前記時間 T_4 の開始より先であり、前記時間 T_6 の終了は前記時間 T_5 の終了よりも後であるように構成したことを特徴とする上記(5)に記載のレーザ走査型顕微鏡。これにより、上記時間 T_4 を併せた時間が完全に上記時間 T_6 の時間内に含まれるようになり一層好ましい。

【0041】(7) レーザ光源としてパルスレーザが用いられていることを特徴とする請求項1乃至3の何れか又は上記(3)乃至(5)の何れかに記載のレーザ走査型顕微鏡。これにより、レーザ光は時間差をもって標本に照射され得る。

【0042】(8) レーザ光源と標本の間に、レーザ光を遮断し得るシャッターが配置されていることを特徴とする請求項1乃至3の何れか又は上記(3)乃至(5)の何れかに記載のレーザ走査型顕微鏡。これにより、シャッターを開閉させて波長の異なるレーザ光を時間差を

もって標本に照射させることが可能となる。

【0043】(9) シャッターとしてカーセルを用いたことを特徴とする上記(8)に記載のレーザ走査型顕微鏡。これにより、透過状態と遮蔽状態の切り替えを高速で行うことが容易となり、効率的にレーザ光を時間差をもって標本面へ照射させることが出来る。

【0044】(10) シャッターとして、レーザ光源と標本との間に配置された微小光偏向素子を用いたことを特徴とする上記(8)に記載のレーザ走査型顕微鏡。これにより、レーザ光を特定の方向へ偏向させる状態と、特定の方向とは別の方向へ偏向させる状態とを高速で切り替えることができ、それによってレーザ光を時間差をもって標本面に照射させることが出来る。

【0045】

【発明の効果】上述の如く本発明によれば、干渉フィルタや高度な位置再現精度を要する機械駆動部を必要とせず、また、励起波長や蛍光色素の様々な組み合わせに対する装置構成の変更を必要とせずに、異なる蛍光波長域の蛍光を単一の光検出装置で検出することが出来る、高い蛍光検出感度を持つレーザ走査型顕微鏡を提供することが出来る。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に係るレーザ走査型顕微鏡の第1実施例を示す図である。

【図2】第1実施例における光検出装置の出力信号強度を示すグラフである。

【図3】本発明に係るレーザ走査型顕微鏡に用いられる微小ミラー素子の拡大図で、(a)は第1実施例における様子、(b)は第1実施例の一変形例及び第2実施例における様子、(c)は後述の第3実施例における様子を夫々示している。

【図4】本発明に係るレーザ走査型顕微鏡の第2及び第3実施例を示す図である。

【図5】第2及び第3実施例における光検出装置の出力信号強度を示すグラフである。

【図6】第3実施例の一変形例における光検出装置の出力信号強度を示すグラフである。

【図7】第3実施例の他の変形例における光検出装置の出力信号強度を示すグラフである。

【図8】本発明に係るレーザ走査型顕微鏡の第4実施例を示す図である。

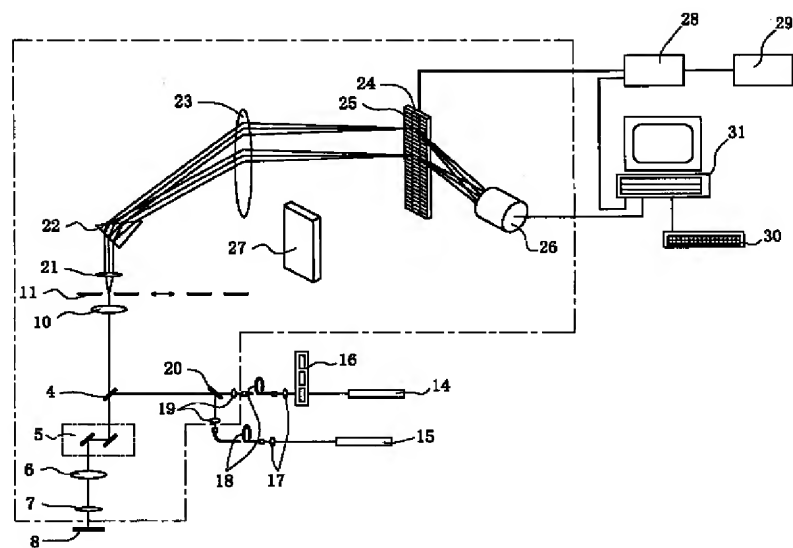
【図9】従来の蛍光用レーザ走査型顕微鏡を示す図である。

【符号の説明】

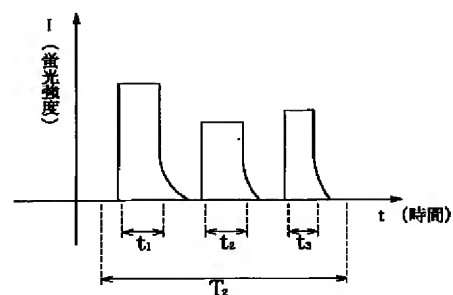
1 a, 1 b, 1 c	レーザ発振器
2 a, 2 b	レーザ結合用ダイクロイックミラー
3	ビームエキスパンダー
4, 20	ダイクロイックミラー
5	X-Y走査光学系

6	瞳リレーレンズ	27	光トラップ
7	対物レンズ	28	コントローラ
8	標本	29	メモリー部
9 a, 9 b	分光用ダイクロイックミラー	30	入力部
10, 10 a, 10 b, 10 c	結像レンズ	31	出力信号処理装置
11, 11 a, 11 b, 11 c	共焦点絞り	32	シャッター
12 a, 12 b, 12 c	吸収フィルタ	t_1, t_2, t_3	蛍光のサンプリング時間
13 a, 13 b, 13 c	光検出器	t_{l1}, t_{l2}	レーザの照射時間
14	マルチラインK r-A rレーザ	t_{s1}, t_{s2}	蛍光のサンプリング時間
15	A rレーザ	t_{f1}, t_{f2}	蛍光のライフタイム
16	レーザラインフィルタ	t_a	第一の蛍光のサンプリング終了
17	ファイバカップリングレンズ	時刻	
18	シングルモードファイバ	t_b	第二の蛍光の検出装置への入射
19	ビームコリメートレンズ	開始時刻	
21	コリメートレンズ	T_2	総ての蛍光をサンプリングする
22	プリズム (スペクトル分解部材)	のに必要な時間	
23	集光レンズ	T_3	2つのレーザ光が標本面に照射
24	ミラーアレイ (微小光偏向素子アレイ)	される時間差	
25, 25 a~25 h	微小ミラー素子 (微小光偏向素子)	T_4	レーザ光の照射時間
26, 26 a, 26 b	光検出装置	T_5	レーザ光の照射により発生する
		蛍光のライフタイム	
		T_6	蛍光のサンプリング時間

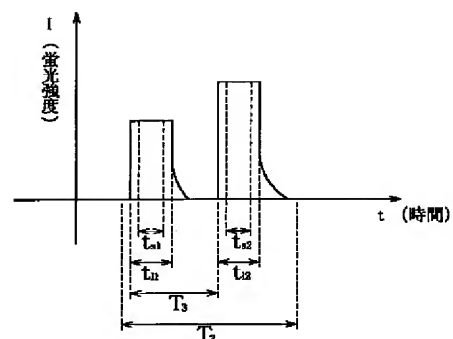
【図1】



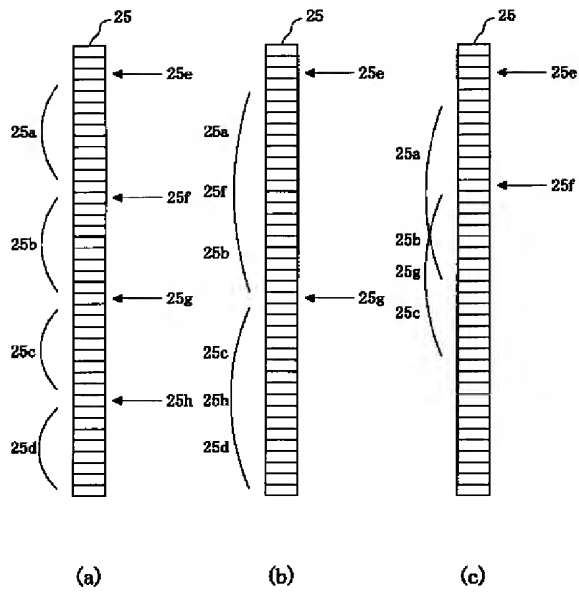
【図2】



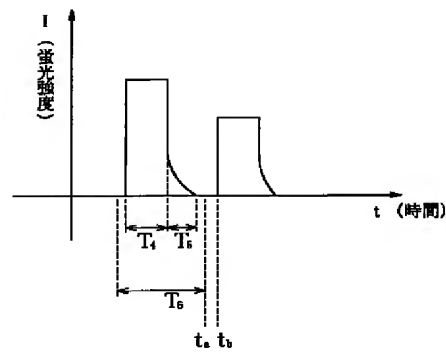
【図5】



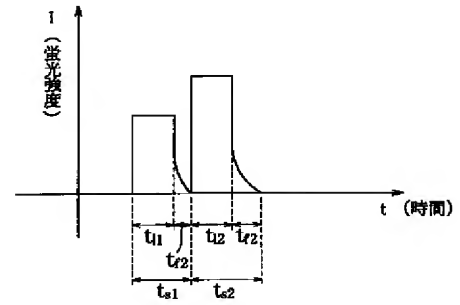
【 3】



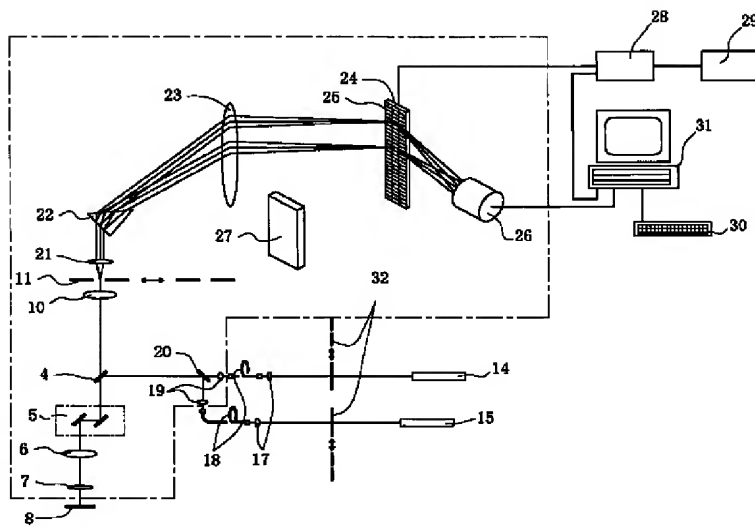
【 6】



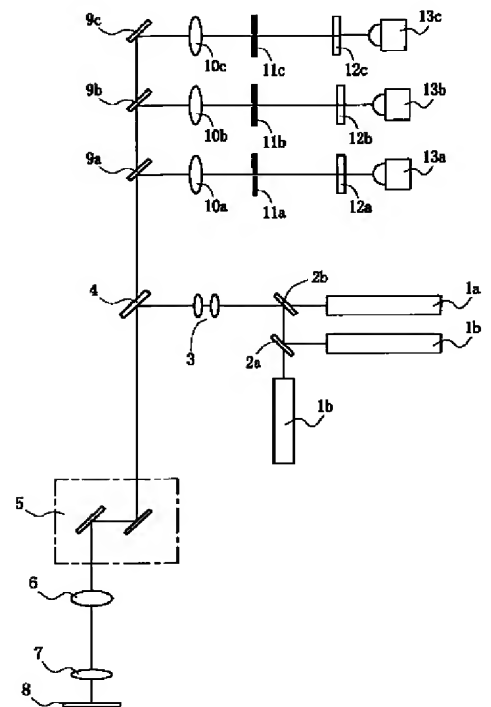
【 7】



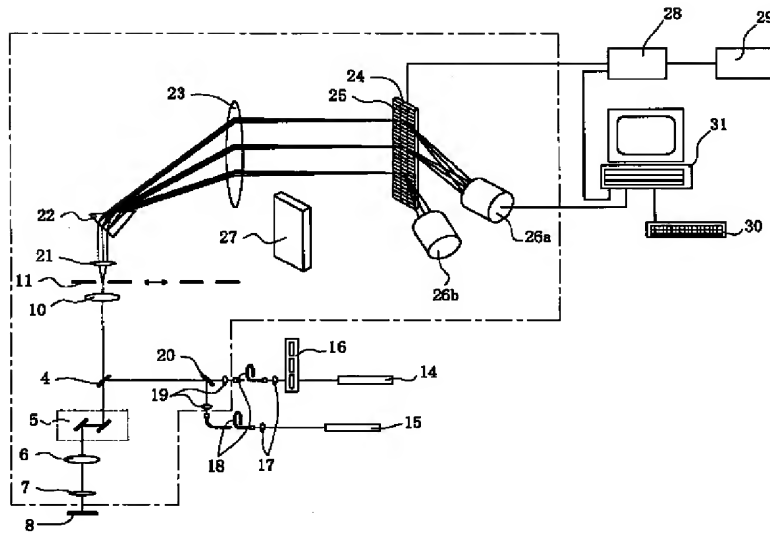
【 4】



【 9】



【図8】



フロントページの続き

Fターム(参考) 2G043 AA01 AA04 BA16 CA04 EA01
FA02 GA01 GB01 HA01 HA02
HA05 HA09 HA11 HA15 JA02
JA05 KA02 KA03 KA05 KA09
LA01 MA04
2H052 AA08 AA09 AB24 AB25 AC12
AC15 AC26 AC27 AC34 AF07